11 月 November
2019, 62(11): 1305 – 1314
昆　虫　学　报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA
http: //www. insect. org. cn
doi: 10. 16380/j. kcxb. 2019. 11. 008

枣食芽象甲线粒体基因组全序列测定与系统发育分析

张　锋[1,2], 洪　波[1,2,*], 王远征[1,2], 李英梅[1,2], 陈志杰[1,2]

(1. 陕西省生物农业研究所, 西安 710043; 2. 陕西省酶工程技术研究中心, 西安 710043)

摘要:【目的】从线粒体基因组水平上探讨枣食芽象甲 *Scythropus yasumatsui* 与近缘种的系统发育关系。【方法】利用 Illumina MiSeq 测序平台对枣食芽象甲线粒体基因组进行测序,对基因组序列进行拼装、注释和特征分析;利用贝叶斯法和最大似然法构建基于象甲科 13 个物种的线粒体基因组 13 个蛋白质编码基因核苷酸序列的系统发育树。【结果】结果表明,枣食芽象甲线粒体基因组全长为 16 472 bp(GenBank 登录号: MF807224),包含 13 个蛋白质编码基因、22 个 tRNA 基因、2 个 rRNA 基因和 2 个非编码控制区,37 个基因的排列顺序与祖先昆虫的线粒体基因排列顺序一致。13 个蛋白质编码基因的起始密码子为 ATN,其中除了 *cob* 和 *nad*1 基因的完全终止密码子为 TAG 外,其余 11 个基因的完全终止密码子为 TA(A)。22 个 tRNA 基因中除了 *trnS*1 缺少 DHU 臂,反密码子由 GCT 变为 TCT 外,其余均能形成典型的三叶草结构。基于 13 个蛋白质编码基因序列构建的系统发育树结果显示,象甲科 8 个亚科系统发育关系为:(((隐喙象亚科(Cryptorhynchinae) + (象虫亚科(Curculioninae) + 魔喙象亚科(Molytinae))) + 长小蠹亚科(Platypodinae)) + (粗喙象亚科(Entiminae) + Cyclominae 亚科)) + 隐颏象亚科(Dryophthorinae) + 小蠹亚科(Scolytinae))。【结论】在 13 种象甲科昆虫物种中,同属于粗喙象亚科的枣食芽象甲与南美果树象甲 *Naupactus xanthographus* 在系统发育树中聚为同一分支,表明基于线粒体基因组全序列的分子系统发育结果与传统的形态分类结果是一致的。

关键词: 鞘翅目; 象甲科; 枣食芽象甲; 近缘种; 线粒体基因组; 蛋白质编码基因; 系统发育

中图分类号: Q969. 94　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 0454-6296(2019)11-1305-10

Sequencing and phylogenetic analysis of the complete mitochondrial genome of *Scythropus yasumatsui* (Coleoptera: Curculionidae)

ZHANG Feng[1,2], HONG Bo[1,2,*], WANG Yuan-Zheng[1,2], LI Ying-Mei[1,2], CHEN Zhi-Jie[1,2] (1. Bio-Agriculture Institute of Shaanxi, Xi'an 710043, China; 2. Enzyme Engineering Research Center of Shaanxi, Xi'an 710043, China)

Abstract:【Aim】To explore the phylogenetic relationship between *Scythropus yasumatsui* and related species at the mitochondrial genome level.【Methods】Using Illumina MiSeq platform, the mitochondrial genome of *S. yasumatsui* was sequenced, and the genome sequences were assembled, annotated and characterized. Based on the nucleotide sequences of 13 protein-coding genes in the mitochondrial genome, the Bayesian and ML phylogenetic trees of 13 species of the family Curculionidae were constructed.【Results】The results showed that the sequence length of the mitochondrial genome of *S. yasumatsui* is 16 472 bp (GenBank accession no.: MF807224), including 13 protein-coding genes

基金项目: 陕西省科技统筹创新工程项目(2013KTZB-03-01); 陕西省科学院重大科技项目(2013K-02)
作者简介: 张锋, 男, 1973 年 9 月生, 陕西泾阳人, 博士, 研究员, 研究方向为枣树病虫害综合防治, E-mail: 545141529@qq. com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: hb54829@163. com
收稿日期 Received: 2019-04-15; 接受日期 Accepted: 2019-08-23

(PCGs), 22 tRNA genes, 2 rRNA genes and 2 non-coding regions, and the order of genes is consistent with that of the ancestral insect mitochondrial genes. All of the 13 PCGs use ATN as the start codon, and except that *cob* and *nad*1 use TAG as the termination codon, other 11 PCGs use TA(A) as the termination codon. All of the 22 tRNA genes were predicted to contain typical cloverleaf secondary structures except the gene *trnS*1 lacking DHU arm and changing anticodon from GCT to TCT. Phylogenetic tree based on the nucleotide sequences of 13 PCGs showed that the phylogenetic relationship among eight subfamilies of the family Curculionidae was: (((Cryptorhynchinae + (Curculioninae + Molytinae)) + Platypodinae) + (Entiminae + Cyclominae)) + Dryophthorinae + Scolytinae). 【Conclusion】The phylogenetic tree based on the mitochondrial genome showed that among the 13 species of the family Curculionidae, *S. yasumatsui* and *Naupactus xanthographus* belonging to the subfamily Entiminae clustered together in the same branch of phylogenetic tree, and this result is consistent with that of traditional morphological classification.

Key words: Coloptera; Curculionidae; *Scythropus yasumatsui*; related species; mitochondrial genome; protein-coding gene; phylogeny

线粒体广泛存在于昆虫体内,它在控制昆虫的新陈代谢、生命周期、凋亡、病害等方面起着重要作用(聂瑞娥和杨星科, 2014)。线粒体基因组具有母系遗传,进化速率快,几乎不发生重组的特点,是研究不同动物类群起源、进化、系统发育及群体遗传学的理想分子标记(李国宏等, 2012)。鞘翅目是世界上最具多样性的类群,目前已知有 39 万余种(Zhang, 2013),其线粒体基因组结构简单,序列长度相对较短,基因之间排列十分紧凑,不含间隔区和内含子,在遗传过程中不易发生基因重组、倒位、易位等突变,遵守严格的母系遗传方式(Boore, 1999; Moraes *et al*., 2002),这些结构和进化上的特点使线粒体基因广泛应用于鞘翅目昆虫种群遗传、系统地理学、分子系统学等研究(Wilson *et al*., 1985; Wilson *et al*., 2000; 魏书军和陈学新, 2011)。鞘翅目昆虫线粒体基因组的基因顺序和组成相对保守,其蛋白质编码基因的组成基本与祖先昆虫的排列方式是相同的,除了 tRNA 基因有重排外(Timmermans and Vogler, 2012; 陈志腾和杜予州, 2016),基本不发生重排。自 2003 年第一个鞘翅目昆虫线粒体全基因组被测定以来(Friedrich and Muqim, 2003),线粒体全基因组在鞘翅目中的研究逐渐增多,到目前为止(截至 2019 年 1 月),NCBI 中公布的鞘翅目昆虫线粒体全基因组序列有 1 142 个(一些未鉴定到种),其中象甲科有 31 种,但有关枣食芽象甲线粒体基因组研究的报道未见涉及。鞘翅目昆虫的线粒体基因组大小一般在 14 257 ~ 21 628 bp 之间,为闭合双链,包含 2 个核糖体 RNA(rRNA)基因、22 个转运 RNA(tRNA)基因和 13 个蛋白质编码基因,以及 1 个非编码区,称为控制区(control region)(聂瑞娥和杨星科, 2014; Kim *et al*., 2015)。昆虫线粒体基因组双链中,多数基因在主编码链(major strand)J 链上编码,少数基因在次编码链(minor strand)N 链上编码(Simon *et al*., 1994)。

枣食芽象甲 *Scythropus yasumatsui* 属鞘翅目(Coloptera)多食亚目(Polyphaga)象虫总科(Curculionoidea)象甲科(Curculionidae),又名枣飞象、灰象鼻虫、枣月象、太谷月象等,是枣树上的一种重要害虫(王鸿哲和李宽胜, 1992)。成虫春季主要取食枣树的嫩芽和幼叶,严重时嫩芽被全部吃光,导致尖端光秃,枣树二次萌芽后节间生长短,开花结果推迟,严重降低枣果的品质和产量(任登州和齐向英, 2009)。主要分布于陕西、山西、河南等地红枣主要产区(黄维正和李东成, 1993; 任登洲和齐向英, 2009; 唐学亮等, 2013; 张锋等, 2017),除危害枣树外,还危害苹果、梨、核桃、杨树、泡桐、香柏等多种果树和林木。

本研究采用 Illumina MiSeq 二代测序技术测定枣食芽象甲线粒体基因组全序列,在报道该种线粒体基因组特点的同时,基于 13 个蛋白质编码基因序列构建了象甲科 13 个物种的贝叶斯(Bayesian)和最大似然(maximum likelihood, ML)系统发育树,与相关的近缘种线粒体基因组进行了比较分析,以期为象甲科系统分类学研究提供分子生物学证据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

枣食芽象甲成虫标本于 2017 年 4 月 20 日采集

自陕西省佳县佳芦镇小会坪村山地枣园内，标本采集后立即置于无水酒精中浸泡保存，带回实验室后置于－20℃冰箱中保存备用。

1.2　枣食芽象甲线粒体基因组序列测定

选取 10 头枣食芽象甲成虫，在体视镜下切取胸部后，按照天根公司的血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒说明书方法操作。将提取的枣食芽象甲总 DNA 经过核酸浓度分析仪和 1% 琼脂糖凝胶电泳进行质量检测后，送上海派森诺生物科技股份有限公司进行测序。本研究采用全基因组鸟枪法（whole genome shotgun, WGS）策略，构建文库，利用第二代测序技术（next generation sequencing, NGS），基于 Illumina MiSeq 测序平台，对这些文库进行双末端（paired-end, PE）测序。

1.3　序列注释及特征分析

采用 A5-miseqv20150522 和 SPAdesv3.9.0 对 1.2 节获得的高质量的二代测序数据进行从头拼装，构建 contig 和 scaffold 序列。将序列同 NCBI 上的 nt 库进行 blastn（BLASTv2.2.31＋）比对，挑出各拼接结果的线粒体序列。

将以上不同软件得到的线粒体拼接结果利用 MUMmerv3.1 软件进行共线性分析，确定 contig 间的位置关系，进行 contigs 间 gap 的填补。使用 Pilonv1.18（Walker *et al.*, 2014）软件对结果进行校正以得到最终的线粒体序列。将序列上传至 MITOS 网页服务器（http://mitos.bioinf.uni-leipzig.de/）进行功能注释（Bernt *et al.*, 2013），查看每个 tRNA 二级结构的预测结果。

1.4　系统发育分析

为了研究枣食芽象甲与近缘种之间的亲缘关系，选择了拟步甲科赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 作为外群，选择来自象甲科中 8 个亚科（族）12 个物种，包括隐喙象亚科（Cryptorhynchinae）的 2 个种臭椿沟眶象 *Eucryptorrhynchus brandti* 和沟眶象 *Eucryptorrhynchus chinensis*，象虫亚科（Curculioninae）的 1 个种栗实象甲 *Curculio davidi*，魔喙象亚科（Molytinae）的 1 个种萧氏松茎象甲 *Hylobitelus xiaoi*，长小蠹亚科（Platypodinae）的 1 个种 Platypodinae sp.，粗喙象亚科（Entiminae）的 1 个种南美果树象甲 *Naupactus xanthographus*，Cyclominae 亚科的 1 个种树莓象甲 *Aegorhinus superciliosus*，隐颏象亚科（Dryophthorinae）的 4 个种米象甲 *Sitophilus oryzae*，玉米象甲 *Sitophilus zeamais*，红棕象甲 *Rhynchophorus ferrugineus* 和 *Sphenophorus* sp. 以及小蠹亚科（Scolytinae）的 1 个种 Scolytinae sp.。将 12 种象甲科昆虫与枣食芽象甲和外群基因组的 13 个蛋白质编码基因序列比对后通过软件进行串联，它们的线粒体基因组全序列可从 NCBI 获取，用 MEGA6.0 软件进行线粒体基因组全序列比对，然后分别使用 MrBayes 3.1.2 软件的贝叶斯法（Bayesian）和 MEGA6.0 的最大似然法（ML）构建系统发育树。贝叶斯法所用模型为 GTR＋I＋G，程序运行 10 000 次，舍弃前 250 次老化样本，运行结果在 FigTree1.4.3 中成图。最大似然法所用模型为 GTR＋I＋G，重复运行次数为 10 000，运行结果直接导出成图。

2　结果

2.1　枣食芽象甲线粒体基因组结构

线粒体基因组全长 16 472 bp（GenBank 登录号：MF807224）。基因组核苷酸组成为 A∶T∶C∶G＝39.7%∶34.7%∶15.4%∶10.1%，A＋T 含量（74.5%）高于 G＋C 含量（25.5%）。基因组包括 13 个 PCGs，22 个 tRNA 基因和 2 个 rRNA 基因（*rrnL* 和 *rrnS*）共 37 个基因，以及 2 段非编码控制区。J 链含 9 个蛋白质编码基因和 14 个 tRNA 基因，共 23 个基因；N 链含 4 个蛋白质编码基因、8 个 tRNA 基因和 2 个 rRNA 基因，共 14 个基因。

枣食芽象甲线粒体基因组的 37 个基因次序与鞘翅目祖先昆虫的线粒体基因排列顺序（Boore, 1999；聂瑞娥和杨星科，2014）一致，没有发现基因重排。枣食芽象甲线粒体基因组中共出现 14 处 93 bp的基因序列重叠，长度介于 1～38 bp 之间。最长的重叠序列为 38 bp，位于 *trnL*1 和 *rrnL* 之间；共出现 15 处 134 bp 的基因序列间隔，最长的间隔序列为 25 bp，位于 *nad*1 和 *trnL*1 之间；既无间隔又无重叠的区域共有 6 处，分别位于 *trnL*2 和 *cox*2 之间、*trnD* 和 *atp*8 之间、*trnG* 和 *nad*3 之间、*trnN* 和 *trnS*1 之间、*trnS*1 和 *trnE* 之间以及 *trnT* 和 *trnP* 之间。枣食芽象甲线粒体基因组结构及基因排列顺序和序列特征见图 1 及表 1。

2.2　枣食芽象甲线粒体基因组蛋白质编码基因

线粒体基因组 13 个 PCGs 的序列总长度为 11 123 bp，A＋T 含量为 74.31%，除终止密码子外共编码 3 695 个氨基酸，PCGs 中最长和最短基因分别为 *nad*5（长 1 712 bp）和 *atp*8（长 156 bp），分别编码 570 和 52 个氨基酸。*nad*2，*cox*1，*cox*2，*atp*8，

*nad*3，*nad*5，*nad*6 和 *nad*1 基因的起始密码子为典型的 ATT；*atp*6，*cox*3，*nad*4，*nad4l* 和 *cob* 基因的起始密码子为典型的 ATG。*nad*2，*cox*1，*cox*2，*atp*8，*atp*6，*nad*3，*nad*4，*nad4l* 和 *nad*6 基因的完全终止密码子为 TAA，*cob* 和 *nad*1 基因的完全终止密码子为 TAG，*nad*5 基因具有不完整的终止密码子 TA（表 1）。

2.3 枣食芽象甲线粒体基因组 tRNA 基因和 rRNA 基因

线粒体基因组 22 个 tRNA 基因的序列长度为 63～71 bp，*trnK* 基因最长为 71 bp，*trnW* 基因最短为 63 bp。其中 14 个 tRNA 基因位于 J 链，8 个 tRNA 基因位于 N 链。2 个 rRNA 基因分别为 *rrnL* 和 *rrnS*，它们被 *trnV* 间隔开。*rrnL* 基因序列长度为 1 315 bp，A+T 含量为 78.86%；*rrnS* 基因序列长度为 785 bp，A+T 含量为 78.22%。

在所预测的 22 个 tRNA 基因中，只有 *trnS*1 缺少 DHU 臂，反密码子由 GCT 变为 TCT，其余 tRNA 基因均能形成典型的三叶草结构（Bae *et al*.，2004；林爱丽等，2018）。三叶草结构一般包括 4 个臂：上方为氨基酸接受臂，左方为双氢尿嘧啶臂（DHU），下方为反密码子臂，右方为 TψC 臂（图 2）。在三叶草结构的折叠过程中出现 22 处碱基错配，均为 GU 错配，其中 8 处位于 *trnQ*，*trnC*，*trnY*，*trnF*，*trnH* 和 *trnP* 的 DHU 臂，6 处位于 *trnQ*，*trnA*，*trnL*1，*trnC* 和 *trnV* 的氨基酸接受臂，3 处位于 *trnA*，*trnS*1 和 *trnP* 的 TΨC 臂，5 处位于 *trnD*，*trnF*，*trnH* 和 *trnT* 的反密码子臂。

2.4 枣食芽象甲线粒体基因组控制区

线粒体基因组控制区是其基因组中序列的非编码区，枣食芽象甲线粒体基因组的控制区一共包含 2 段（图 1）。第 1 段控制区（control region 1）长度为 1 377 bp，位于 *rrnS* 与 *trnI* 之间，A+T 含量为 79.3%，表现出明显的 AT 碱基偏向性。该控制区

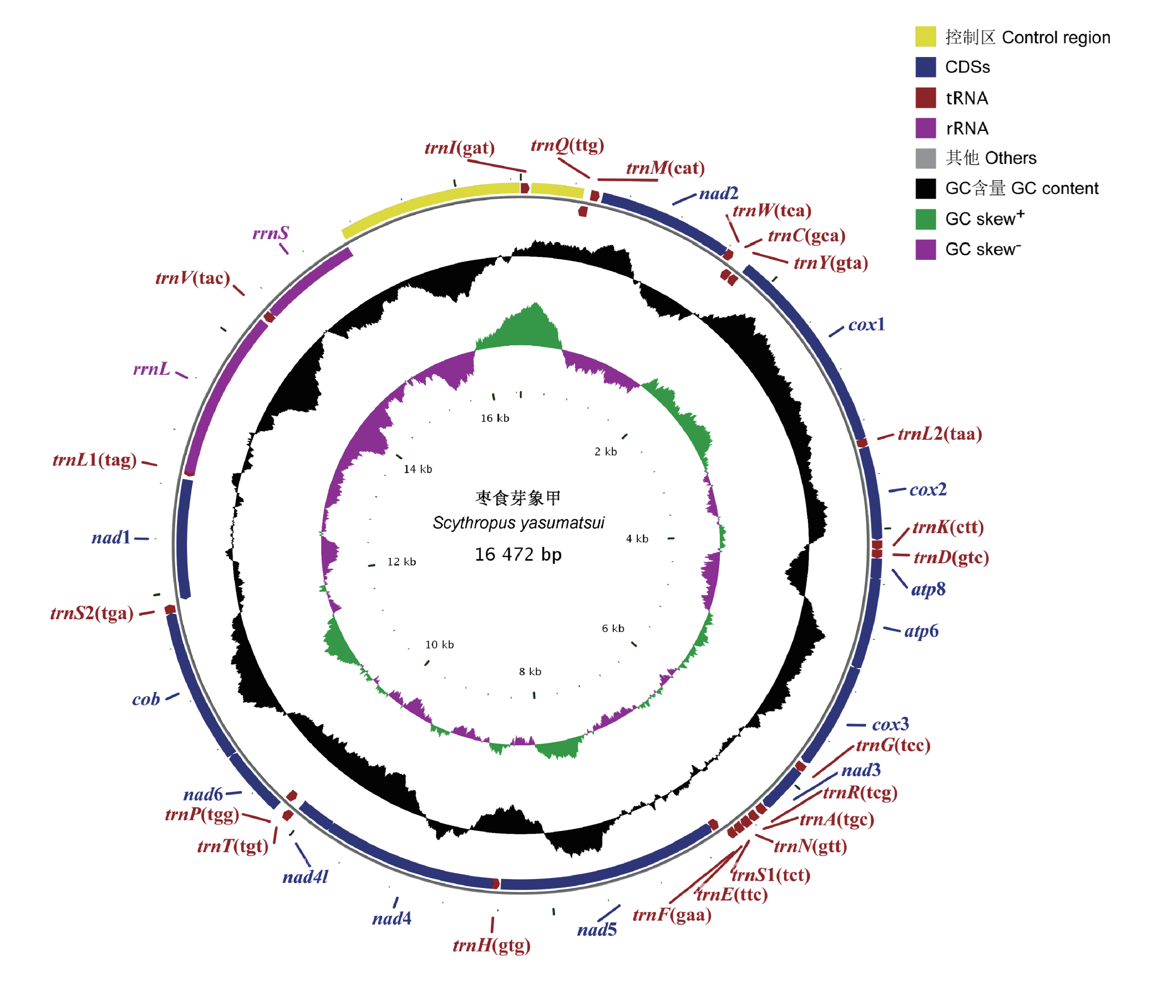


图 1 枣食芽象甲线粒体基因组结构图

Fig. 1 Mitochondrial genome structure of *Scythropus yasumatsui*

CDS：编码序列 Coding sequence；GC skew+：GC 偏斜正值；GC skew−：GC 偏斜负值. 括号中文字表示各 tRNA 基因的反密码子。Texts in brackets refer to the anticodon of tRNA genes.

表 1　枣食芽象甲线粒体基因组注释

Table 1　Annotation of the mitochondrial genome of *Scythropus yasumatsui*

基因 Gene	基因长度(bp) Gene length	位置(bp) Position	基因间隔(bp) Intergenic length	起始密码子 Start codon	终止密码子 Stop codon	反密码子 Anticodon	编码链 Coding strand
trnI	65	1－65				GAT	J
控制区 2 Control region 2	382	66－447	0				－
trnQ	69	448－516	0			TTG	N
trnM	69	519－587	2			CAT	J
*nad*2	999	606－1604	18	ATT	TAA		J
trnW	63	1 603－1 665	－2			TCA	J
trnC	64	1 665－1 728	－1			GCA	N
trnY	66	1 732－1 797	3			GTA	N
*cox*1	1 545	1 790－3 334	－8	ATT	TAA		J
*trnL*2	65	3 330－3 394	－5			TAA	J
*cox*2	687	3 395－4 081		ATT	TAA		J
trnK	71	4 083－4 153	1			CTT	J
trnD	64	4 153－4 216	－1			GTC	J
*atp*8	156	4 217－4 372		ATT	TAA		J
*atp*6	675	4 366－5 040	－7	ATG	TAA		J
*cox*3	789	5 040－5 828	－1	ATG	TAA		J
trnG	64	5 842－5 905	13			TCC	J
*nad*3	354	5 906－6 259		ATT	TAA		J
trnR	67	6 266－6 332	6			TCG	J
trnA	65	6 345－6 409	12			TGC	J
trnN	68	6 412－6 479	2			GTT	J
*trnS*1	66	6 480－6 545				TCT	J
trnE	63	6 546－6 608				TTC	J
trnF	66	6 614－6 679	5			GAA	N
*nad*5	1 712	6 679－8 390	－1	ATT	TA		N
trnH	64	8 400－8 463	9			GTG	N
*nad*4	1 347	8 447－9 793	－17	ATG	TAA		N
*nad*4*l*	288	9 787－10 074	－7	ATG	TAA		N
trnT	64	10 077－10 140	2			TGT	J
trnP	66	10 141－10 206				TGG	N
*nad*6	504	10 209－10 712	2	ATT	TAA		J
cob	1 140	10 712－11 851	－1	ATG	TAG		J
*trnS*2	68	11 850－11 917	－2			TGA	J
*nad*1	927	11 936－12 862	18	ATT	TAG		N
*trnL*1	64	12 888－12 951	25			TAG	N
rrnL	1 315	12 914－14 228	－38				N
trnV	68	14 245－14 312	16			TAC	N
rrnS	785	14 311－15 095	－2				N
控制区 1 Control region 1	1 377	15 096－16 472					－

J：主编码链 Major strand；N：次编码链 Minor strand.

共包括(TA)$_n$ 6 处，其中 4 处为(TA)$_3$，2 处为(TA)$_5$。控制区还存在长度 5 bp 及以上的 Poly-T 共 11 处，其中最长 1 处为 15 bp。另外，在基因组中第 15 135－15 440 bp 位置存在 2 处长度为 131 bp

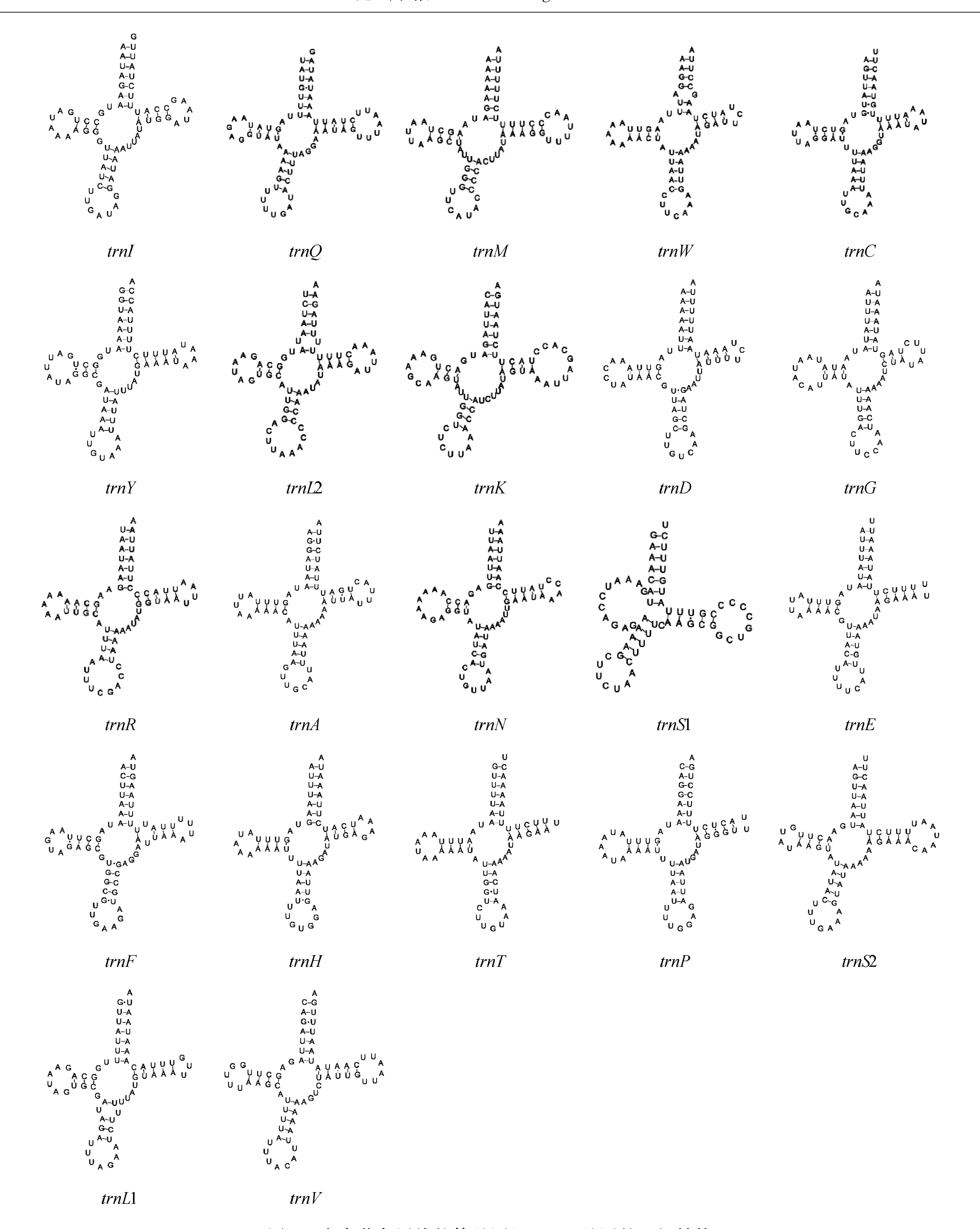


图 2 枣食芽象甲线粒体基因组 tRNA 基因的二级结构

Fig. 2 Predicted secondary structure of tRNA genes in the mitochondrial genome of *Scythropus yasumatsui*

的重复单元(在图 3 中以黄色标记),重复序列之间的间隔为 44 bp (图 3: A)。第 2 段控制区(control region 2)较短,长度为 382 bp,位于 *trnI* 与 *trnQ* 之间,A + T 含量为 32%,该控制区中第 115 – 378 bp 位置存在 3 处长度为 88 bp 的重复单元(在图 3 中以黄色和蓝色标记),重复序列之间的间隔为 0 (图 3: B)。

2.5 象甲科 13 个物种的系统发育分析

贝叶斯系统发育树结果表明(图 4), 8 个亚科系统发育关系为:(((隐喙象亚科(Cryptorhynchinae) + (象虫亚科(Curculioninae) + 魔喙象亚科(Molytinae))) + 长小蠹亚科(Platypodinae)) + (粗喙象亚科(Entiminae) + Cyclominae 亚科)) + 隐颏



图 3　枣食芽象甲线粒体基因组控制区的 2 类重复单元序列(A 和 B)

Fig. 3　Replication sequences of control regions (A and B) of mitochondrial genome of *Scythropus yasumatsui*

A 图中第 1 段控制区的第 15 135 – 15 440 bp 存在 2 处长度为 131 bp 的重复单元(黄色),重复序列之间的间隔为 44 bp; B 图中第 2 段控制区的第 115 – 378 bp 存在 3 处长度为 88 bp 的重复单元(黄色和蓝色),重复序列之间的间隔为 0。The first control region in figure A contains two replication sequences (in yellow) of 131 bp in length between 15 135 bp and 15 440 bp, and there is an intergenic spacer of 44 bp in length between replication sequences. The second control region in figure B contains three replication sequences (in yellow and blue) of 88 bp in length between 115 bp and 378 bp, and there is no intergenic spacer between replication sequences.

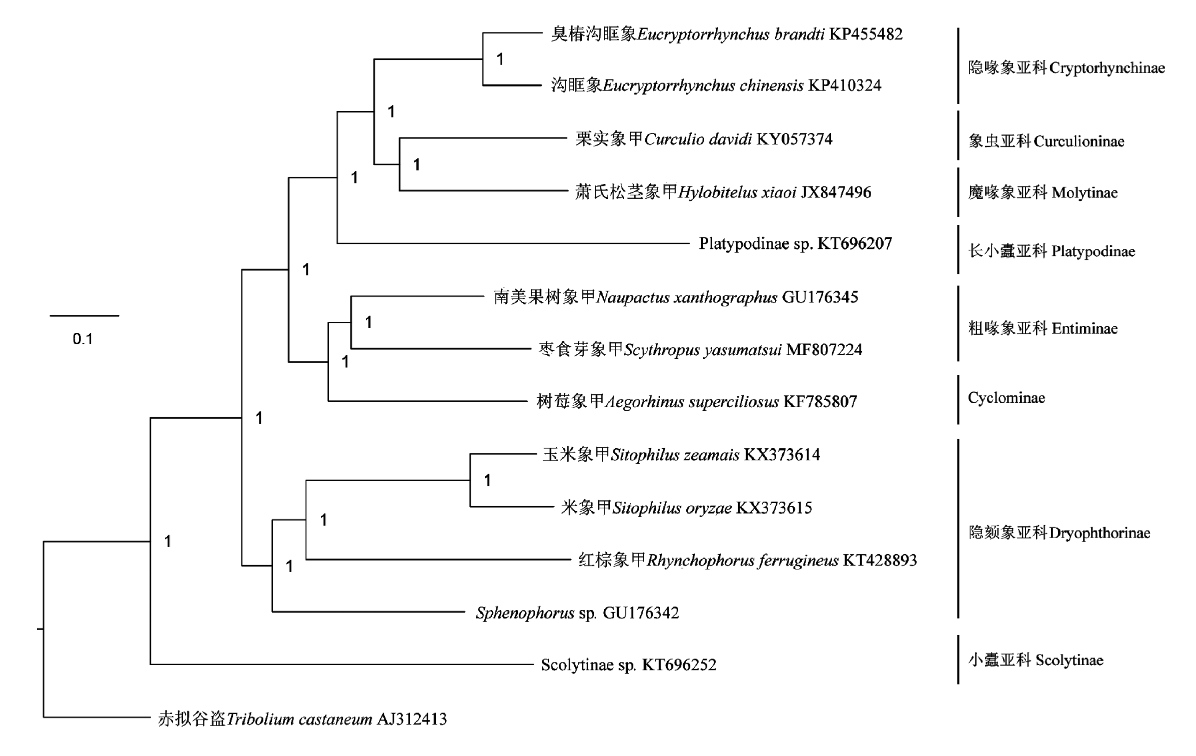


图 4　枣食芽象甲和象甲科其他物种基于 13 个蛋白质编码基因序列的贝叶斯系统发育树

Fig. 4　Bayesian phylogenetic tree of *Scythropus yasumatsui* and other species of the family Curculionidae based on sequences of 13 PCGs

节点旁边的数字代表 Bayesian 树的后验概率。Numbers on nodes refer to Bayesian posterior probabilities.

象亚科(Dryophthorinae)+小蠹亚科(Scolytinae))。13 种象甲科昆虫物种分为 3 个聚类簇:小蠹亚科的 1 个种 Scolytinae sp. 首先构成了第 1 簇,隐颏象亚科的 4 个种米象甲 *Sitophilus oryzae*, 玉米象甲 *S. zeamais*, 红棕象甲 *Rhynchophorus ferrugineus* 和 *Sphenophorus* sp. 构成了第 2 簇,枣食芽象甲与南美果树象甲 *Naupactus xanthographus* 先聚在了一起,又与 Cyclominae 亚科的树莓象甲 *Aegorhinus superciliosus* 相聚,最后与其他 4 个亚科(族)的 5 个种臭椿沟眶象 *Eucryptorrhynchus brandti*, 沟眶象 *E. chinensis*, 栗实象甲 *Curculio davidi*, 萧氏松茎象甲 *Hylobitelus xiaoi* 和 Platypodinae sp. 共同构成了第 3 簇。研究结果表明,在贝叶斯系统发育树的 13 个象甲科物种之中,8 个亚科之间均明显分开,枣食芽象甲与南美果树象甲聚为同一分支,表明它们之间的亲缘关系最近。

基于最大似然法构建的系统发育树如图 5 所示,结果表明 13 个象甲科物种的系统发育树也分为 3 个聚类簇,每个聚类簇和分支包括的物种与贝叶斯系统发育树完全相同,bootstrap 自展值都在 75 以上,表明构建的发育树比较可靠。

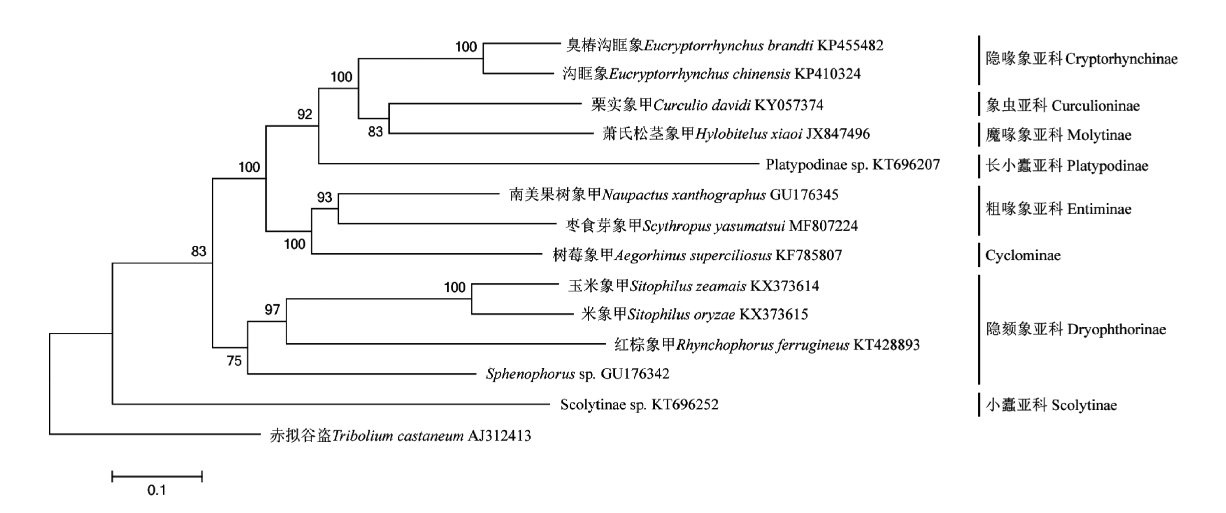


图 5 枣食芽象甲和象甲科其他物种基于 13 个蛋白质编码基因序列的最大似然系统发育树

Fig. 5 Maximum likelihood phylogenetic tree of *Scythropus yasumatsui* and other species of the family Curculionidae based on sequences of 13 PCGs

节点旁边的数字代表 ML 树的自展值。Numbers on nodes refer to ML bootstrap values.

3 讨论

鞘翅目昆虫的线粒体基因组和其他昆虫一样为闭合双链,大小一般为 14 257 ~ 21 628 bp (Bae *et al*., 2004; Kim *et al*., 2015),包括 37 个基因:13 个蛋白质编码基因、22 个 tRNA 基因、2 个 rRNA 基因(*rrnL* 和 *rrnS*)。目前在 GenBank 中所得到的象甲科昆虫完整线粒体基因组有 31 种,枣食芽象甲线粒体基因组全长为 16 472 bp,介于已报道的鞘翅目象甲科昆虫线粒体基因组长度范围之内。

控制区是线粒体基因组中最主要的非编码区,序列长度变异很大,从几十到数千碱基不等,且 A + T 含量非常高。控制区一般位于线粒体基因组的 *rrnS* 和 *trnI* 基因之间,该区域除了核苷酸之间的替换,还包括序列的缺失插入,不同程度的串联重复拷贝等,通常被认为含有线粒体基因组转录和复制的起点(Saito *et al*., 2005; Mancini *et al*., 2008)。在枣食芽象甲线粒体基因组中有 2 段控制区序列,*trnI* 基因位于线粒体基因组 2 段控制区之间,这种情况也出现在中对长小蠹 *Euplatypus parallelus* 和散溢长小蠹 *E. solutes* 等鞘翅目昆虫中(杨艳, 2017)。而 *trnI* 基因在某些象甲科,如大灰象甲 *Sympiezomias velatus* 和南美果树象甲等昆虫的线粒体基因组中会发生缺失的现象(Song *et al*., 2010; Tang *et al*., 2017)。控制区存在 2 类串联重复序列单元,重复序列长度分别为 131 和 88 bp,重复次数分别为 2 次和 3 次,并存在 6 处$(TA)_n$,说明控制区具有多样化的结构特征。另外,控制区还存在长度 5 bp 及以上的 poly-T 共 11 处,其中最长一处为 15 bp,这个可能是全变态昆虫 mtDNA 转录和复制起点的识别位点(Saito *et al*., 2005)。

在枣食芽象甲线粒体蛋白质编码基因中，其 COI 基因（*cox*1）的起始密码子为 ATT，这与已知的多数鞘翅目昆虫不一致。一般来说，祖先昆虫 COI 基因的起始密码子为 ATN，且鞘翅目昆虫其他蛋白质编码基因的起始密码子大多也为 ATN，但鞘翅目昆虫 COI 基因的起始密码子存在争议，有不同的起始密码子，并且多数不是 ATN（Sheffield *et al*., 2008；聂瑞娥和杨星科，2014）。

本研究利用 13 个蛋白质编码基因核苷酸序列建立了象甲科 13 个物种的贝叶斯和最大似然系统发育树，2 种系统发育树结果都表明 13 种昆虫可分为 3 个聚类簇，枣食芽象甲与其他 7 个近缘种构成的第 3 簇系统发育关系为（（臭椿沟眶象 *Eucryptorrhynchus brandti* + 沟眶象 *Eucryptorrhynchus chinensis*）+（栗实象甲 *Curculio davidi* + 萧氏松茎象甲 *Hylobitelus xiaoi*）+ Platypodinae sp.）+（（南美果树象甲 *Naupactus xanthographus* + 枣食芽象甲 *Scythropus yasumatsui*）+ 树莓象甲 *Aegorhinus superciliosus*）。可以看出，枣食芽象甲与南美果树象甲在系统发育树中聚为同一分支，表明它们的亲缘关系较近，而这一分支的物种在昆虫形态学分类中同属于粗喙象亚科（Song *et al*., 2010；于潇，2016），因此基于线粒体的分子系统发育结果与传统的形态分类结果是一致的。

参考文献（References）

Bae JS, Kim I, Sohn HD, Jin BR, 2004. The mitochondrial genome of the firefly, *Pyrocoelia rufa*: complete DNA sequence, genome organization, and phylogenetic analysis with other insects. *Mol. Phylogenet. Evol*., 32: 978 – 985.

Bernt M, Donath A, Jühling F, Externbrink F, Florentz C, Fritzsch G, Pütz J, Middendorf M, Stadler PF, 2013. MITOS: improved *de novo* metazoan mitochondrial genome annotation. *Mol. Phylogenet. Evol*., 69(2): 313 – 319.

Boore JL, 1999. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res*., 27(8): 1767 – 1780.

Chen ZT, Du YZ, 2016. Rearrangement of mitochondrial genome in insects. *J. Environ. Entomol*., 38(4): 843 – 851. [陈志腾, 杜予州, 2016. 昆虫线粒体基因组重排的研究进展. 环境昆虫学报, 38(4): 843 – 851]

Friedrich M, Muqim N, 2003. Sequence and phylogenetic analysis of the complete mitochondrial genome of the flour beetle *Tribolium castaneum*. *Mol. Phylogenet. Evol*., 26: 502 – 512.

Huang WZ, Li DC, 1993. Research on temporal-spatial distribution of *Scythropus yasumatsui* larvae for overwintering. *Entomol. Knowl*., 30(6): 348 – 350. [黄维正, 李东成, 1993. 枣食芽象甲越冬幼虫空间分布格局的研究. 昆虫知识, 30(6): 348 – 350]

Kim MJ, Kim KJ, Kim SR, Kim I, 2015. Complete mitochondrial genome of the two-spotted stag beetle, *Metopodontus blanchardi* (Coleoptera: Lucanidae). *Mitochondr. DNA*, 26(2): 307 – 309.

Li GH, Shang N, Wei JR, 2012. Sequencing and analysis of the complete mitochondrial genome of *Hylobitelus xiaoi* (Coleptera: Curculionidae). *Acta Entomol. Sin*., 55(11): 1306 – 1314. [李国宏, 尚娜, 魏建荣, 2012. 萧氏松茎象线粒体基因组全序列测定与分析. 昆虫学报, 55(11): 1306 – 1314]

Lin AL, Li XX, Zhao XC, Song N, 2018. Analysis of the mitochondrial genome of *Attagenus unicolor japonicus* (Coleoptera: Dermestidae) and a phylogenetic analysis of Dermestidae. *Acta Entomol. Sin*., 61(4): 477 – 487. [林爱丽, 李欣欣, 赵新成, 宋南, 2018. 黑毛皮蠹线粒体基因组分析及皮蠹科系统发育分析. 昆虫学报, 61(4): 477 – 487]

Mancini E, De Biase A, Mariottini P, Bellini A, Audisio P, 2008. Structure and evolution of the mitochondrial control region of the pollen beetle *Meligethes thalassophilus* (Coleoptera: Nitidulidae). *Genome*, 51(3): 196 – 207.

Moraes C, Srivastava S, Kirkinezos I, Oca-Cossio J, van Waveren C, Woischnick M, Diaz F, 2002. Mitochondrial DNA structure and function. *Int. Rev. Neurobiol*., 53: 3 – 23.

Nie RE, Yang XK, 2014. Research progress in mitochondrial genomes of Coleoptera. *Acta Entomol. Sin*., 57(7): 860 – 868. [聂瑞娥, 杨星科, 2014. 鞘翅目昆虫线粒体基因组研究进展. 昆虫学报, 57(7): 860 – 868]

Ren DZ, Qi XY, 2009. Preliminary study on the control of *Scythropus yasumatsui* in northern Shaanxi. *J. Hebei Agric. Sci*., 13(6): 40 – 41. [任登州, 齐向英, 2009. 陕北地区枣食芽象甲防治初探. 河北农业科学, 13(6): 40 – 41]

Saito S, Tamura K, Aotsuka T, 2005. Replication origin of mitochondrial DNA in insects. *Genetics*, 171(4): 1695 – 1705.

Sheffield NC, Song H, Cameron SL, Whiting MF, 2008. A comparative analysis of mitochondrial genomes in Coleoptera (Arthropoda: Insecta) and genome descriptions of six new beetles. *Mol. Biol. Evol*., 25(11): 2499 – 2509.

Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P, 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am*., 87(6): 651 – 701.

Song H, Sheffield NC, Cameron SL, Miller KB, Whiting MF, 2010. When phylogenetic assumptions are violated: base compositional heterogeneity and among-site rate variation in beetle mitochondrial phylogenomics. *Syst. Entomol*., 35(3): 429 – 448.

Tang PA, Zhang L, Li XP, Li FF, Yuan ML, 2017. The complete mitochondrial genome of *Sympiezomias velatus* (Coleoptera: Curculionidae). *Mitochondr. DNA Part B*, 2(2): 449 – 450.

Tang XL, Zhao HZ, Zhang XW, 2013. Techniques for the control of *Scythropus yasumatsui* in the northern Shaanxi. *Shaanxi For. Sci. Technol*., (4): 131 – 132. [唐学亮, 赵宏志, 张学武, 2013. 陕北枣树枣食芽象甲防治技术研究. 陕西林业科技, (4): 131 – 132]

Timmermans MJTN, Vogler AP, 2012. Phylogenetically informative

rearrangements in mitochondrial genomes of Coleoptera, and monophyly of aquatic elateriform beetles (Dryopoidea). *Mol. Phylogenet. Evol.*, 63(2): 229 - 304.

Walker BJ, Abeel T, Shea T, Priest M, Abouelliel A, Sakthikumar S, Cuomo CA, Zeng Q, Wortman J, Young SK, Earl AM, 2014. Pilon: an integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement. *PLoS ONE*, 9(11): e112963.

Wang HZ, Li KS, 1992. Control measures for major pests in jujube forests in northern Shaanxi. *Shaanxi For. Sci. Technol.*, (3): 52 - 55. [王鸿哲, 李宽胜, 1992. 陕北枣树主要害虫防治对策. 陕西林业科技, (3): 52 - 55]

Wei SJ, Chen XX, 2011. Progress in research on the comparative mitogenomics of insects. *Chin. J. Appl. Entomol.*, 48(6): 1573 - 1585. [魏书军, 陈学新, 2011. 昆虫比较线粒体基因组学研究进展. 应用昆虫学报, 48(6): 1573 - 1585]

Wilson AC, Cann RL, Carr SM, George M, Gyllensten U, Helm-Bychowski KM, Higuchi RG, Palumbi SR, Prager EM, Sage RD, Stoneking M, 1985. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biol. J. Linn. Soc.*, 26(4): 375 - 400.

Wilson K, Cahill V, Ballment E, Benzie J, 2000. The complete sequence of the mitochondrial genome of the crustacean *Penaeus mondon*: are malacostracan crustaceans more closely related to insects than to branchiopods? *Mol. Biol. Evol.*, 17(6): 863 - 874.

Yang Y, 2017. Sequencing and Analysis of the Complete Mitochondrial Genome of Four Curculionoidea Insects. MSc Thesis, Shaanxi Normal University, Xi'an. [杨艳, 2017. 四种象甲总科昆虫线粒体基因组的测定与分析. 西安: 陕西师范大学硕士学位论文]

Yu X, 2016. The Species Composition and Faunal Analysis of Weevil in Qingling of Shaanxi Province. MSc Thesis, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong. [于潇, 2016. 陕西秦岭地区象虫种类组成及区系分析. 山东泰安: 山东农业大学硕士学位论文]

Zhang F, Hong B, Zhang SL, Chen ZJ, 2017. Research on population dynamics and field distribution of *Scythropus yasumatsui*. *J. Shaanxi Agric. Sci.*, 63(1): 38 - 41. [张锋, 洪波, 张淑莲, 陈志杰, 2017. 枣食芽象甲种群动态及田间分布规律研究. 陕西农业科学, 63(1): 38 - 41]

Zhang ZQ, 2013. Phylum Arthropoda. *Zootaxa*, 3703(1): 17 - 26.

(责任编辑: 马丽萍)